

PEMANFAATAN BERBAGAI SENYAWA NITRIL DAN PRODUK DEGRADASINYA SEBAGAI SUBSTRAT UNTUK PERTUMBUHAN ISOLAT BAKTERI TP

[Utilization of Nitril Compounds and Their Degradation Products
as Growth Substrates for Bacterial Isolate TP]

Dyah Supriyati dan Bambang Sunarko

Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16002

ABSTRACT

Our experiments showed that bacterial isolate TP was able to grow on acetonitrile, butyronitrile and propionitrile as sole sources of carbon, energy and nitrogen, but not on acrylonitrile and benzonitrile. Besides on nitriles, isolate TP could grow on acetamide, propionamide, benzamide and nicotinamide, but not on acrylamide. However, none of the tested carboxylic acids could be used as growth substrate for bacterial isolate TP. The best growth substrates of isolate TP were butyronitrile ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$) and propionamide ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CONH}_2$). When isolate TP grew on butyronitrile, the highest biomass concentration, the doubling-time (td), and the specific growth rate (μ) were 8.99 gram cell dry weight/liter, 4.8 h and 0.144 h^{-1} , and when grew on propionamide were 4.57 gram cell dry weight/liter, 5.7 h and 0.122 h^{-1} , respectively.

Kata kunci/ key words: *Isolat Bakteri TP/bacterial isolate TP, senyawa nitril/nitrile compounds, degradasi/degradation, pertumbuhan/growth.*

PENDAHULUAN

Senyawa-senyawa nitril (R-CN) merupakan kelompok senyawa yang sangat toksik, namun secara komersial banyak digunakan dalam industri, misalnya pada industri pertambangan, cat, pelapisan logam, fotografi, pestisida dsb. Oleh karena itu, tidaklah mengherankan bila saat ini perhatian pada mikroba pendegradasi senyawa nitril terus meningkat. Mikroba-mikroba tersebut diharapkan dapat dimanfaatkan dalam penanggulangan limbah berupa senyawa-senyawa nitril (Meyer *et al*, 1989; O'Grady dan Pembroke, 1994) maupun dalam sintesis berbagai senyawa kimia (Langdahl *et al*, 1996; Sunarko, 1999).

Sampai saat ini telah diketahui bahwa senyawa nitril dapat didegradasi secara mikrobial melalui dua alur reaksi (Nagasawa *et al*, 1987; Wyatt and Linton, 1988; Sunarko, 1995). Degradasi senyawa nitril alifatik secara umum melibatkan dua enzim, yaitu nitril-hidratase (E.C. 4.3.2.84) dan amidase (E.C. 3.5.1.4). Enzim nitril-

hidratase mengkatalisis hidrolisis senyawa nitril (R-CN) menjadi senyawa amida (R-CONH_2), dan enzim amidase selanjutnya mengkatalisis hidrolisis amida tersebut menjadi asam karboksilat (R-COOH) dan amonia (NH_4^+). Degradasi senyawa nitril aromatik melibatkan hanya satu enzim, yaitu nitrilase (E.C.3.5.5.1) yang menghidrolisis senyawa nitril (R-CN) langsung menjadi asam karboksilat (R-COOH) dan amonia (NH_4^+), tanpa terbentuk senyawa antara amida (R-CONH_2).

Dari penelitian sebelumnya dapat diketahui bahwa isolat TP mampu tumbuh dengan cepat pada senyawa nitril sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen untuk tumbuhnya sampai dengan konsentrasi tinggi (Supriyati and Sunarko, 1999). Tujuan penelitian ini adalah untuk meneliti lebih lanjut kemampuan isolat tersebut dalam memanfaatkan senyawa nitril dan produk-produk degradasinya. Dari penelitian ini, diharapkan dapat diperoleh gambaran tentang preferensi isolat tersebut terhadap senyawa-

senyawa nitril dan produk degradasinya sebagai substrat untuk tumbuhnya. Informasi ini akan dapat digunakan sebagai landasan untuk karakterisasi enzim nitril-hidratase dan amidase isolat TP dan kemungkinan pemanfaatannya.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme

Isolat TP diisolasi dari sampel yang diambil dari tempat pembuangan limbah pabrik tekstil.

Medium mineral untuk pertumbuhan isolat TP

Komposisi medium mineral yang digunakan untuk menumbuhkan isolat bakteri TP adalah sebagai berikut: Na_2HPO_4 (0,357 g), JCH_2PO_4 (0,1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g), *yeast extract* (0,01 g), mikroelemen (1,0 ml) dan aquadest sampai dengan 1000 ml (Meyer and Schlegel, 1983). Komposisi mikroelemen (Pfenning, 1974) sebagai berikut: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,03 g), H_3BO_3 (0,3 g), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g), $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,9 g), Na_2SeO_3 (0,02 g) dalam akuades 1000 ml.

Pengujian pertumbuhan isolat bakteri TP pada berbagai nitril

Isolat bakteri TP ditumbuhkan dalam 250 ml Erlenmeyer berisi 50 ml media mineral yang masing-masing mengandung 0,5% (v/v) asetonitril, propionitril, butironitril, akrilonitril dan benzonitril. Pengujian dilakukan dalam tiga kali ulangan. Kultur tersebut kemudian diinkubasi selama satu minggu pada suhu kamar ($\pm 25^\circ\text{C}$) di atas mesin pengocok. Pengamatan pertumbuhan mikroba dilakukan dengan mengukur kerapatan optis pada panjang gelombang 436 nm.

Pengujian pertumbuhan isolat TP pada berbagai senyawa amida

Isolat bakteri TP ditumbuhkan dalam 250 ml Erlenmeyer berisi 50 ml media mineral yang

masing-masing mengandung 0,5% (b/v) asetamida, propionamida, nikotinamida, akrilamida dan benzamida. Masing-masing percobaan diulang tiga kali. Kultur mikroba kemudian diinkubasi selama satu minggu pada suhu kamar ($\pm 25^\circ\text{C}$) di atas mesin pengocok. Pertumbuhan mikroba diketahui dari pengukuran kerapatan optis pada panjang gelombang 436 nm.

Pengujian pertumbuhan isolat TP pada berbagai asam karboksilat

Isolat bakteri TP ditumbuhkan dalam 250 ml Erlenmeyer berisi pada 50 ml media mineral yang masing-masing mengandung 50 mM asam asetat, asam propionat, asam nikotinat, asam akrilat dan asam benzoat. Sebagai sumber nitrogen ditambahkan 50 mM NittNCV . Penelitian diulang tiga kali. Kultur mikroba tersebut kemudian diinkubasi selama satu minggu, pada suhu kamar ($\pm 25^\circ\text{C}$) di atas mesin pengocok. Pertumbuhan mikroba diketahui dari hasil pengukuran kerapatan optis dengan panjang gelombang 436 nm.

Penentuan pola pertumbuhan isolat TP pada berbagai senyawa amida

Isolat bakteri TP ditumbuhkan dalam 500 ml Erlenmeyer berisi 250 ml media mineral yang masing-masing mengandung 0,5% (b/v) asetamida, propionamida, nikotinamida, akrilamida dan benzamida. Inkubasi dilakukan selama delapan hari pada suhu kamar ($\pm 25^\circ\text{C}$) di atas mesin pengocok. Pertumbuhan mikroba diikuti setiap hari dengan mengukur kerapatan optis pada panjang gelombang 436 nm.

Pengujian pola pertumbuhan isolat TP pada berbagai senyawa nitril

Isolat ditumbuhkan dalam 500 ml Erlenmeyer berisi 250 ml media mineral yang masing-masing mengandung 1% (v/v) asetonitril, propionitril, butironitril, akrilonitril dan benzonitril. Inkubasi dilakukan selama delapan hari pada suhu kamar di atas mesin pengocok. Pertumbuhan

mikroba diikuti setiap hari dengan mengukur kerapatan optis pada panjang gelombang 436 nm.

HASIL

Pengujian kemampuan tumbuh isolat TP pada berbagai senyawa nitril menunjukkan, bahwa isolat TP ternyata mampu tumbuh pada asetonitril, butironitril dan propionitril sebagai satu-satunya sumber karbon, nitrogen dan energi, namun tidak mampu tumbuh pada akrilonitril dan benzonitril (Gambar 1). Pertumbuhan tertinggi diperlihatkan oleh isolat TP yang ditumbuhkan pada butironitril dengan konsentrasi biomassa sebesar 3,63 gram sel/liter (Tabel 1). Pertumbuhan isolat TP pada propionitril menghasilkan konsentrasi biomassa sebesar 2,14 gram sel/liter dan pada asetonitril sebesar 0,73 gram sel/liter.

Untuk mengetahui lebih lanjut rentang kemampuan isolat TP dalam mensintesis enzim amidase, maka dilakukan pengujian kemampuan tumbuh isolat tersebut pada berbagai senyawa amida. Hasil pengujian menunjukkan, bahwa isolat TP mampu tumbuh pada asetamida, nikotinamida, propionamida dan benzamida, tetapi tidak pada akrilamida (Gambar 2). Pertumbuhan tertinggi ditunjukkan oleh isolat TP yang ditumbuhkan pada benzamida sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen dengan perolehan biomassa sebesar 3,13 gram sel/liter (Tabel 1). Pada propionamida, isolat TP juga masih menunjukkan pertumbuhan yang baik; dengan perolehan biomassa sebesar 2,95 gram/liter. Pertumbuhan isolat TP pada asetamida dan nikotinamida masing-masing hanya menghasilkan konsentrasi biomassa sebesar 1,40 gram/liter dan 0,87 gram/liter.

Pola pertumbuhan isolat TP dalam berbagai senyawa nitril ditampilkan pada Gambar 4

dan Tabel 2. Pertumbuhan tertinggi isolat TP ditunjukkan pada butironitril yang dicapai pada hari ke-7 dengan konsentrasi biomassa sebesar 8,99 g sel bobot kering/liter. Dari pola pertumbuhan tersebut dapat pula ditentukan perkiraan waktu penggandaan (t_j), yaitu sekitar 4,8 jam, dengan laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar $0,144 \text{ jam}^{-1}$. Konsentrasi biomassa maksimal isolat TP pada asetonitril dan propionitril adalah masing-masing sebesar 0,28 g sel bobot kering/liter dan 0,52 g sel bobot kering/liter yang dicapai pada hari ke-2 dan ke-5. Dari penentuan waktu penggandaan (t_j) dan laju pertumbuhan spesifik (μ) isolat TP pada asetonitril adalah sebesar 21,6 jam dan $0,032 \text{ jam}^{-1}$, sedangkan pada propionitril sebesar 7,2 jam dan $0,096 \text{ jam}^{-1}$. Pada akrilonitril dan pada benzonitril isolat TP tampaknya tidak menunjukkan adanya pertumbuhan.

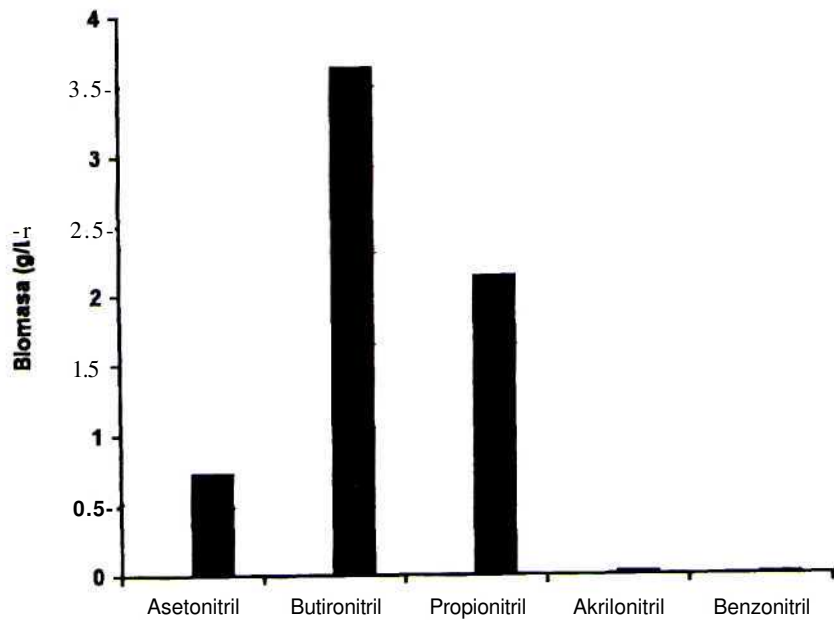
Pola pertumbuhan isolat TP dalam berbagai senyawa amida ditampilkan pada Gambar 5 dan Tabel 2. Dari gambar dan tabel tersebut tampak bahwa isolat TP mampu tumbuh pada propionamida, asetamida dan pada benzamida, namun tidak mampu tumbuh pada akrilamida dan pada nikotinamida. Pertumbuhan tertinggi isolat TP ditunjukkan pada propionamida dengan konsentrasi biomassa sebesar 4,57 g sel bobot kering/liter yang dicapai pada hari ke-3 dengan waktu penggandaan (t_d) dan laju pertumbuhan spesifik (μ) masing-masing sebesar 5,7 jam dan $0,122 \text{ jam}^{-1}$. Pertumbuhan pada asetamida dan pada benzamida masing-masing menghasilkan biomassa maksimum sebesar 3,92 g sel bobot kering/liter dan 1,34 g sel bobot kering/liter, dengan waktu penggandaan (t_j) masing-masing sebesar 6,4 jam dan 12 jam, dan laju pertumbuhan spesifik masing-masing sebesar $0,109 \text{ jam}^{-1}$ dan $0,058 \text{ jam}^{-1}$.

Tabel 1. Pertumbuhan isolat TP pada berbagai senyawa nitril, amida dan asam asam karboksilat

Substrat	Biomassa (g/l)	Substrat	Biomassa (g/l)	Substrat	Biomassa (g/l)
Asetonitril	0,73	Asetamida	1,40	Asam asetat	0
Butironitril	3,63	Nikotinamida	0,87	Asam nikotinat	0
Propionitril	2,14	Propionamida	2,95	Asam propionat	0
Benzonitril	0	Benzamida	3,13	Asam benzoat	0
Akronitril	0	Akrilamida	0	Asam akrilat	0

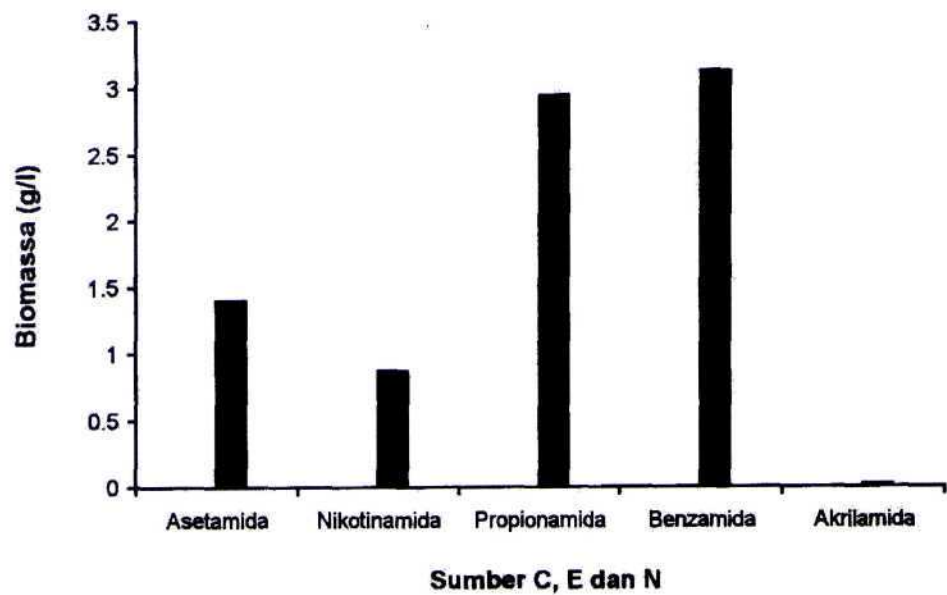
Tabel 2: Waktu /penggandaan (tj), laju pertumbuhan spesifik (li) dan perolehan biomassa maksimal dari isolat TP yang ditumbuhkan pada berbagai senyawa nitril dan amida

Substrat		Waktu peng-gandaan l(td) (Jam)	Laju pertum-buhan spesifik (li)(jam ⁻¹)	Biomassa maksimal (g/l)
Senyawa nitril				
Asetonitril	CH ₃ -CN	21,6	0,032	0,28
Propionitril	CH ₃ -CH ₂ -CN	7,2	0,096	0,52
Akronitril	CH ₂ =CH-CN	-	-	-
Butironitril	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CN	4,8	0,144	8,99
Benzonitril	C ₆ H ₅ -CN	-	-	-
Senyawa amida				
Asetamida	CH ₃ -CONH ₂	6,4	0,109	3,92
Propionamida	CH ₃ -CH ₂ -CONH ₂	5,7	0,122	4,57
Akrilamida	CH ₂ =CH-CONH ₂	-	-	-
Nikotinamida	C ₅ H ₄ N-CONH ₂	28,2	0,024	0,39
Benzamida	C ₆ H ₅ -CONH ₂	12,0	0,058	1,34

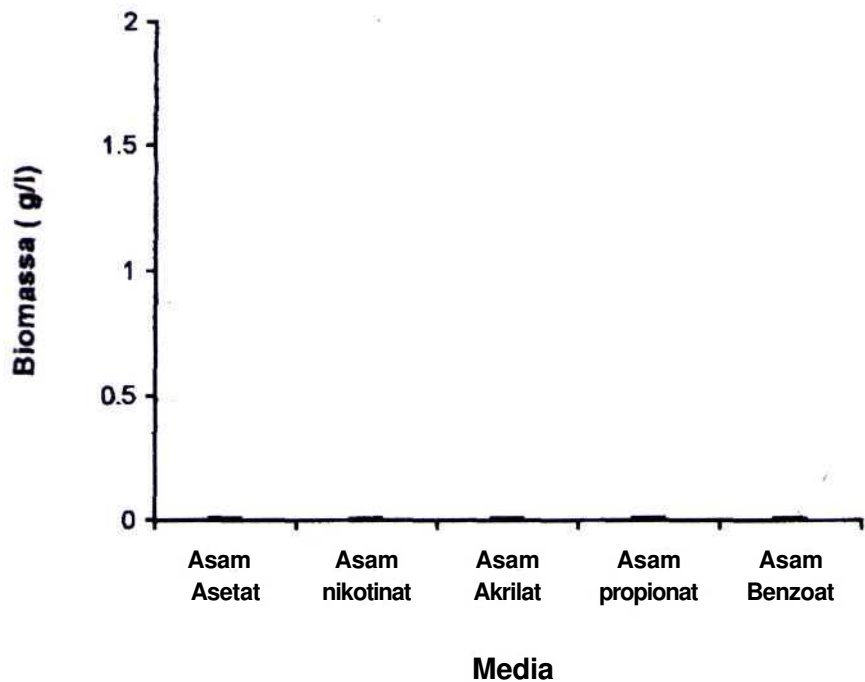


Sumber C, E dan N

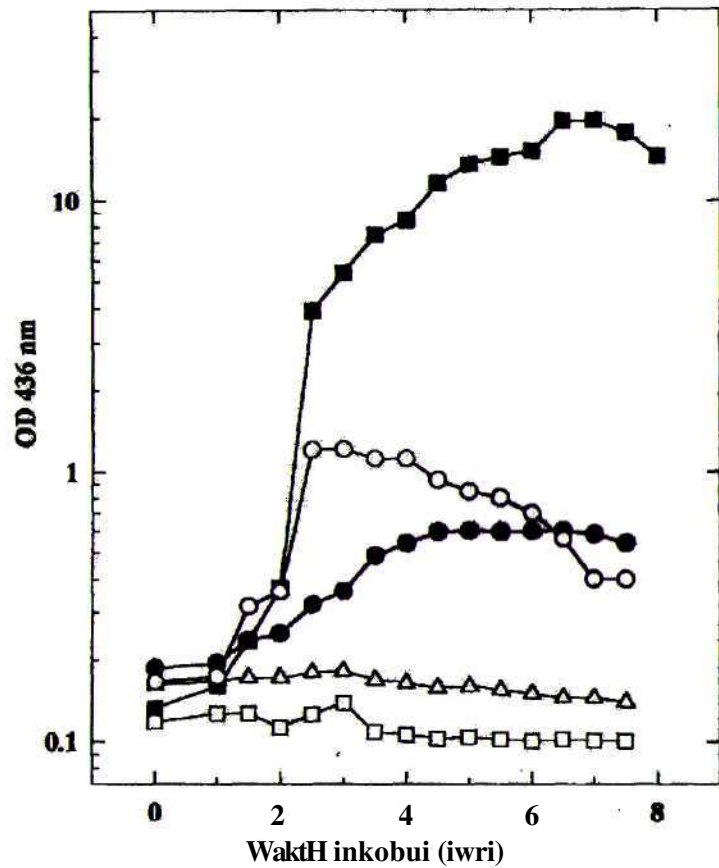
Gambar 1. Pertumbuhan Isolat TP pada berbagai senyawa nitril



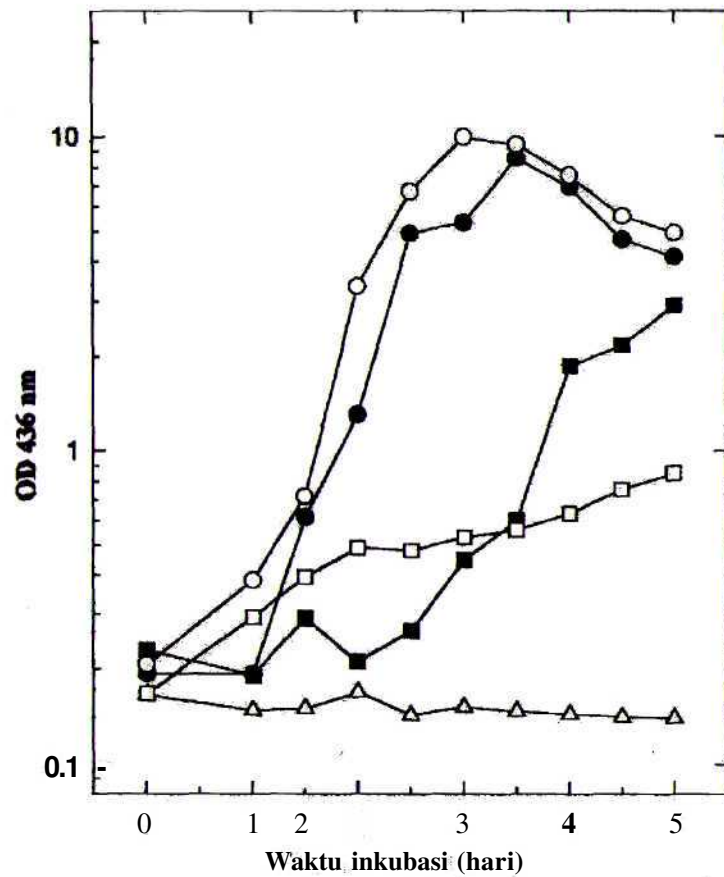
Gambar 2. Pertumbuhan Isolat TP pada berbagai senyawa Amida



Gambar 3. Pertumbuhan Isolat TP pada berbagai asam karboksilat



Gambar 4. Pola Pertumbuhan isolat TP pada berbagai senyawa nitril
 • Asetonitril • Butironitril
 ○ Propionitril D Akrilonitril
 A Benzonitril



Gambar 5. Pola Pertumbuhan isolat TP pada berbagai senyawa Amida
 • Asetamida • Nikotinamida
 ○ Propionamida A Akrilamida
 • Benzamida

PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang ditampilkan pada Gambar 1 dan Tabel 1 mengindikasikan bahwa isolat TP mempunyai preferensi pada senyawa nitril alifatik sebagai substrat untuk pertumbuhannya daripada senyawa nitril aromatik (benzonitril). Hal ini dapat diinterpretasikan bahwa isolat TP hanya mampu mensintesis enzim nitril-hidratase dan amidase, dan bukan enzim nitrilase (DiGeronimo *et al.*, 1976; Asano *et al.*, 1980; Nagasawa *et al.*, 1987; Wyatt and Linton, 1988; Sunarko, 1995; Briglia *et al.*, 1996). Dengan demikian, ketidakmampuan isolat TP untuk tumbuh pada akrilonitril mungkin lebih disebabkan oleh reaktivitas/toksitas senyawa tersebut daripada oleh ketidakmampuan isolat tersebut dalam mensintesis enzim pendegradasi nitril.

Hasil yang ditampilkan pada Gambar 2 dan Tabel 1 mempertegas dugaan bahwa isolat TP mampu mensintesis enzim amidase, yaitu enzim yang menjembatani hidrolisis senyawa-senyawa amida tersebut menjadi asam-asam karboksilat turunannya, seperti yang diuraikan oleh DiGeronimo *et al.* (1976), Asano *et al.* (1980), Sunarko (1995) dan Briglia *et al.* (1996). Namun, tampaknya isolat TP tidak mampu tumbuh pada satupun senyawa karboksilat yang diujikan (Tabel 1 and Gambar 3). Kecenderungan yang sama dilaporkan pula oleh Pumomo (1999) dan Sulistinah dan Sunarko (1999).

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat TP mampu tumbuh pada asetnitril, butironitril dan propionitril sebagai sumber karbon, nitrogen, dan energi, namun tidak pada akrilonitril dan benzonitril. Isolat TP juga mampu tumbuh pada asetamida, propionamida, benzamida dan nikotinamida, tetapi tidak pada akrilamida. Pada asam-asam karboksilat, isolat TP tidak mampu tumbuh pada satupun senyawa yang diujikan. Dari keseluruhan senyawa yang diujikan, butironitril dan propionamida merupakan substrat per-

tumbuhan terbaik bagi isolat TP. Bila ditumbuhkan pada butironitril, perolehan biomassa tertinggi, waktu penggandaan (t_d), dan laju pertumbuhan spesifik (μ) masing-masing dapat ditentukan sebesar 8,99 gram sel bobot kering /liter, 4,8 jam dan 0,144 jam⁻¹. Pada propionamida, perolehan biomassa tertinggi, waktu penggandaan (t_d), dan laju pertumbuhan spesifik (μ) masing-masing dapat ditentukan sebesar 4,57 gram sel bobot kering /liter, 5,7 jam dan 0,122 jam⁻¹.

DAFTAR PUSTAKA

- Asano Y, Tani Y and Yamad H. 1980. A New Enzyme "Nitrile Hydratase" which Degrades Acetonitrile in Combination with Amidase. *Agric. Biol. Chem.* **44** (9), 2251-2252.
- Briglia M, Nakatsuka Y, Sugai T and Ohta H. 1996. Action of Nitrile Hydratase from *Rhodococcus Rhodochrous* IFO 15564 on Derivates of 2,5-Anhydro-D-Allonitrile. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** (9), 1540-1542.
- DiGeronimo MJ and Antoine AD 1976. Metabolism of Acetonitrile and Propionitrile by *Nocardia Rhodochrous* LL100-21. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**(6), 900-906.
- Langdahl BR, Bisp P and Ingvorsen K. 1996. Nitrile Hydrolysis by *Rhodococcus Erythropolis* BL1, an Acetonitrile-Tolerant Strain Isolated from A Marine Sediment. *Microbiology* **142**, 145-154.
- Meyer O and Schlegel HG. 1983. Biology of Aerobic Carbon Monoxide Oxidizing Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 277-310.
- Meyer O, Sander A and Sunarko B. 1989. Verfahren und Biologisch aktive Substanzen zum Mikrobiologischen Abbau von Acetonitril in Mobilen Phasen der Hochdruck-Fluessigkeit-Chromatographie. *German Patent No.* 38 31 396
- Nagasawa T, Nanaba H, Ryuno K, Takeuchi K, Yamada H. 1987. Nitrile Hydratase of *Pseudomonas Chlororaphis* B23. *Eur. J. Biochem.* **162**, 1305-1312.
- O'Grady D and Pembroke JT . 1994. Isolation of a Novel *Agrobacterium* spp. Capable of Degrading a Range of Nitrile Compounds. *Biotechnol. Lett.* **16** (1), 47-50.

- Pfennig N. 1974.** *Rhodopseudomonas globiformis* sp.n., a New Species of the *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.* **100**, 197-206.
- Purnomo D. 2000.** Biokonversi Akrilonitril menjadi Akrilamida dan Asam Akrilat oleh Sel *Corynebacterium* D5. *Skripsi*. FMIPA, IPB.
- Sulistinah N dan Sunarko B. 1999.** Pertumbuhan Isolat Bakteri D1 pada berbagai Senyawa Nitril. *J. Biol. Indonesia* II (**5**), 250 -257.
- Sunarko B. 1995.** Mikrobieller Abbau von Acetonitril und Vinylacetat und Characterisierung von Vinylacetatesterase. *Disertasi*. Universität Bayreuth.
- Sunarko B. 1999.** Biokonversi 3-Sianopiridin menjadi Nikotinamida dan Asam Nikotinat dengan *Corynebacterium* D5 sebagai Biokatalisator. KIPNAS VII, Serpong, 10 September 1999.
- Supriyati D dan Sunarko B. 1999.** Pertumbuhan berbagai Isolat Bakteri pada Propionitril. *J. Mikrob. Trop.* **2**, 25-31.
- Wyatt JM and Linton EA. 1988.** The Industrial Potential of Microbial Nitrile Biochemistry. Dalam: Cyanide Compo-unds in Biology. Mehnert, J and Brimer L (Eds.). John Wiley and Sons, Chichester. Him 32-42.